

Det här verket har digitaliserats vid Göteborgs universitetsbibliotek. Alla tryckta texter är OCR-tolkade till maskinläsbar text. Det betyder att du kan söka och kopiera texten från dokumentet. Vissa äldre dokument med dåligt tryck kan vara svåra att OCR-tolka korrekt vilket medför att den OCR-tolkade texten kan innehålla fel och därför bör man visuellt jämföra med verkets bilder för att avgöra vad som är riktigt.

This work has been digitized at Gothenburg University Library. All printed texts have been OCR-processed and converted to machine readable text. This means that you can search and copy text from the document. Some early printed books are hard to OCR-process correctly and the text may contain errors, so one should always visually compare it with the images to determine what is correct.



7

DOKTORSAVHANDLINGAR
VID
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Nr 27

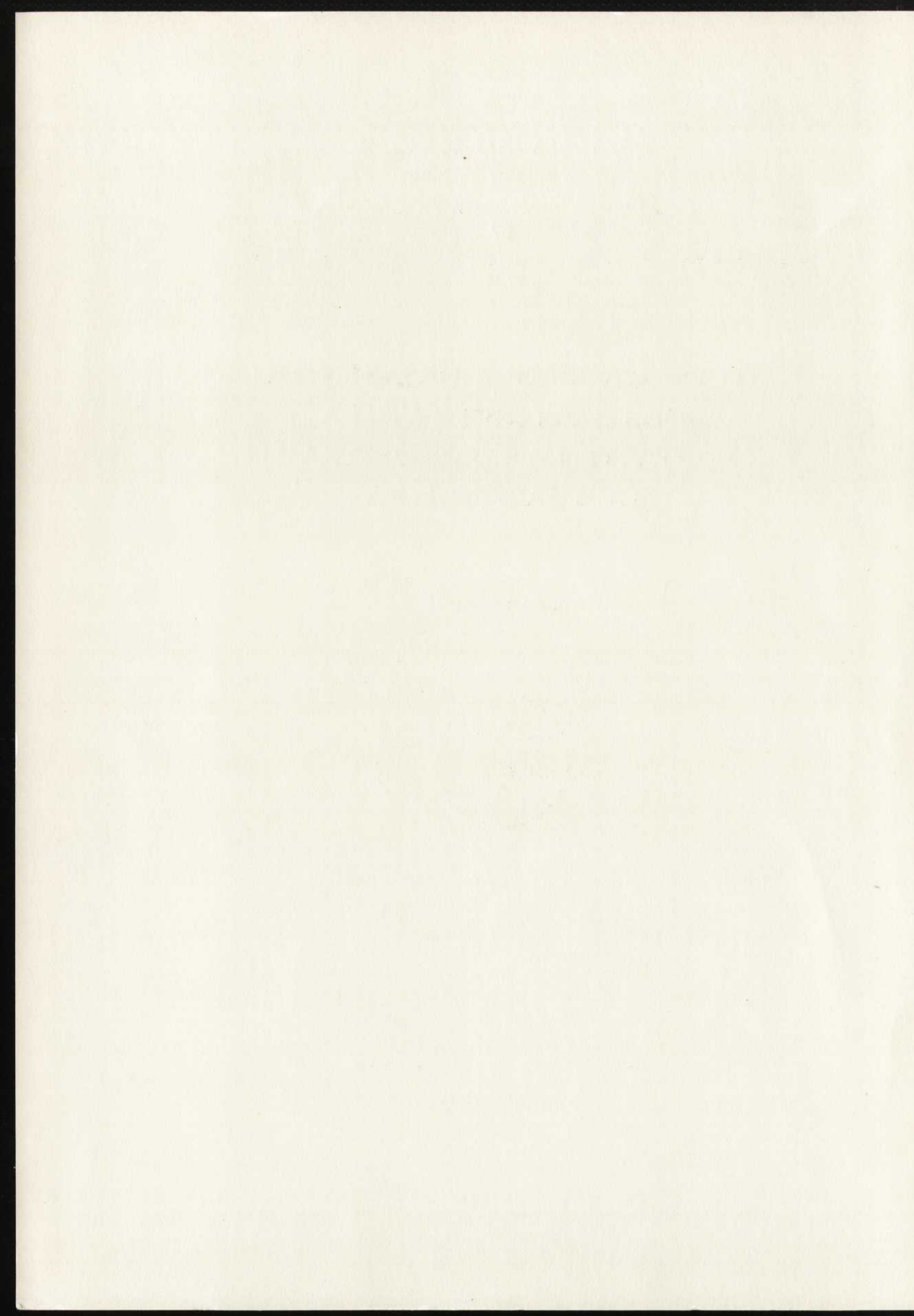
STUDIER RÖRANDE ORSAKEN TILL
DEN BAKTERIOSTATISKA
EFFEKTEN AV BENSOESYRA
OCH SALICYLSYRA

AV
INGMAR BOSUND



GÖTEBORG 1960





DOKTORSAVHANDLINGAR
VID
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Nr

STUDIER RÖRANDE ORSAKEN TILL
DEN BAKTERIOSTATISKA
EFFEKTEN AV BENSOESYRA
OCH SALICYLSYRA

AV
INGMAR BOSUND



GÖTEBORG 1960

Förteckning över i avhandlingen sammanfattade publikationer:

- I. BOSUND, I. The Bacteriostatic Action of Benzoic and Salicylic Acids I. The Effect on the Oxidation of Glucose and Pyruvic Acid by *Proteus vulgaris*. *Acta Chem. Scand.* 13 (1959) 803.
- II. BOSUND, I. The Bacteriostatic Action of Benzoic and Salicylic Acids II. The Effect on Acetate Metabolism. *Acta Chem. Scand.* 14 (1960) 111.
- III. BOSUND, I. The Bacteriostatic Action of Benzoic and Salicylic Acids III. The Effect on Pyruvate and Acetate Oxidation by Different Organisms. *Acta Chem. Scand.* 14 (1960) 1231.
- IV. BOSUND, I. The Bacteriostatic Action of Benzoic and Salicylic Acids IV. The Effect on Oxidation of TCA Cycle Intermediates, Lactate and Gluconate. *Acta Chem. Scand.* 14 (1960) 1243.
- V. BOSUND, I. The Bacteriostatic Action of Benzoic and Salicylic Acids V. Influence of pH on the Total Uptake of Benzoic Acid by *Proteus vulgaris* and Baker's Yeast. *Physiol. Plant.* 13 (1960) 793.
- VI. BOSUND, I., ERICHSEN, I. and MOLIN, N. The Bacteriostatic Action of Benzoic and Salicylic Acids VI. Influence of Amino Acids and Related Substances on the Growth Inhibition. *Physiol. Plant.* 13 (1960) 800.
- VII. BOSUND, I. The Bacteriostatic Action of Benzoic and Salicylic Acids VII. The Effect on Assimilation and Formation of Adaptive Enzymes in *Pseudomonas fluorescens*. *Physiol. Plant.* 13 (1960) 812.
- VIII. BOSUND, I. The Effect of Salicylic Acid, Benzoic Acid and some of Their Derivatives on Oxidative Phosphorylation. *Acta Chem. Scand.* 11 (1957) 541.

Inledning

Bensoesyra har under en lång följd av år använts som tillsatsmedel till livsmedel för att skydda dessa mot förstöring genom angrepp av mikroorganismer. Ett stort antal undersökningar har utförts rörande dess effekt i detta avseende. Trots detta har man hittills vetat ganska litet om var i mikroorganismernas metabolism bensoesyra främst ingriper. Orsaken är, att flertalet gjorda arbeten främst har gått ut på att kartlägga bensoesyrans användningsområde som konserveringsmedel, d. v. s. fastställa i vilka typer av livsmedel och mot vilka arter av mikroorganismer bensoesyra utgör ett verksamt skydd. Det är naturligt, att dessa undersökningar i allmänhet ej ger någon antydning om orsaken till den antimikrobiella effekten. Andra arbeten behandlar bensoesyrans inverkan på metabolismen hos vävnader och celler från människor eller djur. De resultat, som här redovisas, kan inte utan vidare tillämpas på frågan om hur den tillväxthämmande effekten på mikroorganismer utövas. De relativt fåtaliga arbeten, som utförts med direkt avsikt att klarlägga detta, har icke varit tillräckliga för att läggas till grund för någon teori.

Salicylsyra har en kraftigare inverkan på tillväxten av de flesta mikroorganismer än bensoesyra men har ett mycket begränsat användningsområde som konserveringsmedel på grund av dess toxiska effekter på den mänskliga organismen. Den och vissa av dess derivat har i stället ett stort medicinskt användningsområde bl. a. som febernedsättande medel och mot reumatiska sjukdomar. Det är under sådana förhållanden naturligt, att intresset för salicylsyra nästan helt varit koncentrerat till dess inverkan på animala celler. På detta område har viktiga rön gjorts under senare år, delvis parallellt med denna avhandlings tillblivande.

Det är trots det ovan sagda förvånande, att den litteratur, som behandlar orsaken till bensoesyrans och salicylsyrans effekt på mikroorganismer ur biokemisk synpunkt, är av så liten omfattning, eftersom båda föreningarna kemiskt sett är mycket enkla och kan betraktas som grundsubstanser för en hel rad biologiskt intressanta ämnen. Det torde vara onödigt att påpeka, att ökad kunskap om dessa grund-

substansers verkningar på metabolismen hos alla slag av levande celler måste vara av stort intresse.

Avsikten med undersökningen

Syftet med föreliggande arbete har varit att fastställa var i mikroorganismernas metabolism bensoesyra och salicylsyra främst ingriper.

Den tillväxthämmande effekten av ett kemiskt ämne på en viss mikroorganism kan endast i undantagsfall tillskrivas en specifik inverkan på en enda metabolisk reaktion. I allmänhet är effekten resultatet av en samtidig hämning av flera olika enzymatiska processer. Alldeles särskilt torde detta vara fallet i fråga om inhibitorer av enkel uppbyggnad med små möjligheter till kemisk specificitet. Man bör också hålla i minnet, att verkningsmekanismen kan variera från en mikroorganism till en annan eller med försöksbetingelserna, som t. ex. odlingslösningens sammansättning.

Man kan uppställa åtminstone tre villkor, som måste vara uppfyllda, för att blockerandet av en viss enzymatisk process med en inhibitor skall kunna anses vara den primära orsaken till en tillväxthämmande effekt:

1. Den hämmade processen måste vara av vital betydelse för cellens förmåga till reproduktion.
2. Det hämmande ämnet måste påverka ifrågavarande process och tillväxten vid samma koncentration.
3. Substitutioner i inhibitormolekylen bör ha samma inverkan på hämningen av den enzymatiska processen som på hämningen av tillväxten.

Vikten av att beakta dessa villkor spelade stor roll vid planerandet och utförandet av det arbete, som här presenteras.

Undersökningarna utfördes så gott som uteslutande med intakta celler. Den främsta orsaken härtill var det ofta observerade förhållandet, att experiment med isolerade enzym eller enzymsystem i studier av det slag det här gäller icke sällan visat sig vara vilseledande. Dessutom framgick det under arbetets gång, att de flesta av de effekter av bensoesyra och salicylsyra, som observerades i experiment med intakta celler, utövades på processer, som inte eller endast med svårighet kan reproduceras i isolerade system.

Då det ansågs principiellt viktigt att direkt kunna kvantitativt jämföra olika effekter med varandra, utfördes huvuddelen av arbetet med en enda mikroorganism (*Proteus vulgaris*). För komplettering av resultaten och för närmare undersökning av vissa frågor kom emellertid också andra organismer till användning som testobjekt (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* och bagerijäst).

Experimenten omfattar huvudsakligen tillväxtförsök under olika betingelser, respirationsförsök med icke växande celler enligt Warburg-metodiken, isotopförsök, adsorptionsförsök med intakta celler och mitokondrieförsök.

pH-värdets inflytande på effekten

Det iaktogs tidigt av många forskare, att effekten av bensoesyra och salicylsyra på intakta celler ökar med sjunkande pH (1, 2). Detta har som i analoga fall tillskrivits förhållandet, att endast neutrala molekyler utan hinder kan passera det semi-permeabla membran, som omger alla levande celler, medan joner antingen adsorberas eller repelleras. Oberoende av hur inträngandet sker, bör man emellertid vänta sig en pH-effekt av det observerade slaget på grund av den stora lipoidlösligheten hos de odissocierade syramolekylerna jämfört med anjonerna.

Det bör understrykas, att man inte på förhand får ta för givet, att inhibitormolekylerna verkligen måste tränga in i cellen, för att den tillväxthämmande effekten skall uppnås. I själva verket har det just beträffande bensoesyra och salicylsyra påpekats möjligheten av, att dessa ämnen påverkar cellerna främst genom att adsorberas på cellmembranen och därmed omöjliggöra dess funktion (3). Även med utgångspunkt från en sådan teori bör man vänta sig en viss ökning i effekten med sjunkande pH, eftersom adsorptionen av negativt laddade bensoat- och salicylatjoner på membranytan måste öka, ju mer positivt laddad denna är.

Som nämndes ovan har pH-värdets inflytande på den tillväxthämmande effekten av bensoesyra och salicylsyra studerats av många forskare. Bland arbeten under senare år kan särskilt nämnas de som utförts av von Schelhorn (4, 5). Det är emellertid påtagligt, att man endast i ett fåtal fall undersökt, om hämningen av enskilda reaktioner hos intakta celler varierar på motsvarande sätt med det omgivande mediets pH.

I författarens egna undersökningar konstaterades genomgående en direkt proportionalitet mellan hämningen av olika processer hos intakta celler med bensoesyra och salicylsyra och koncentrationen odissocierad syra i den omgivande lösningen (I, III, VI). De effekter som särskilt studerades i detta avseende var: hämning av tillväxten hos *P. vulgaris* och bagerijäst, inverkan på pyruvat- och acetatoxidationen hos bagerijäst samt stimulering av den endogena andningen hos samma organism.

I artikel V beskrivs försök, som direkt visar, att de undersökta organismerna verkligen adsorberade större mängder inhibitor, ju lägre pH var. Den huvudsakliga avsikten med dessa experiment var att få en uppfattning om hur höga koncentrationer av bensoesyra som förekom i cellerna under de aktuella försöksbetingelserna. Under antagande av att bensoesyran fördelade sig likformigt över hela cellvolymen beräknades från experimenten med jästceller att koncentrationen inne i cellerna vid låga pH måste ha varit upp till 25 gånger högre än i den omgivande lösningen. Detta innebär, att medelkoncentrationen bensoesyra i jästceller av detta slag vid tillväxthämning är ungefär 25 mM (tämligen oberoende av odlingslösningens pH-värde). Eftersom en cell inte är homogen utan innehåller många olika strukturer inbäddade i protoplasma, kan de verkliga koncentrationerna av en inhibitor inom särskilda områden av cellen säkerligen vara betydligt högre än medelkoncentrationen. Det är lätt att inse, att bensoesyra inom sådana områden kan hämma många olika processer utan att äga någon högre grad av kemisk specificitet. Det kan tilläggas, att de under sådana förhållanden hämmade processerna troligen inte skulle påverkas lika kraftigt isolerade från cellen.

Inverkan på olika oxidativa processer

1. Oxidation av glykos, pyruvat och laktat

Bensoesyra och salicylsyra stoppar specifikt oxidationen av glykos och pyruvat hos *P. vulgaris* på acetatnivån (I). Oxidationen av laktat blockeras inte på motsvarande sätt, vilket visar, att pyruvat som bildas från glykos och exogent pyruvat inte står i omedelbar jämvikt med pyruvat, som bildas från laktat (IV). Hastigheten av syreupptagandet med glykos som substrat stimuleras av båda inhibitorerna under

första delen av oxidationen, d. v. s. innan acetatets oxidationsnivå nåtts. I princip samma inverkan kan iakttagas på oxidationen av glykos och pyruvat hos *E. coli* men ej hos *Ps. fluorescens* eller bagerijäst (III). Inte heller erhålles någon blockering på acetatnivån hos *P. vulgaris* eller *E. coli*, om cellerna odlats med acetat som enda kol-källa (II, III). Dessa skillnader diskuteras i ifrågavarande artiklar med utgångspunkt från vad som är känt om respektive organismers pyruvatmetabolism.

Resultaten kan sammanfattas på följande sätt. De glykolytiska enzymer hämmas inte utan stimuleras tvärtom ofta av bensoesyra och salicylsyra i koncentrationer, som helt stoppar cellreproduktion. Inte heller påverkas den direkta oxidationen av pyruvat till fritt acetat. Denna reaktionsväg leder emellertid ingenstans och är ur metabolisk synpunkt värdelös; den teoretiskt möjliga energivinsten tas inte till vara och det bildade acetatet kan inte användas av cellerna utan att först aktiveras i en energikrävande process. Om oxidationen av pyruvat i stället är kopplad till fortsatt utnyttjande av acetylgruppen som energikälla (genom TCA-cykeln) eller för biosyntes (t. ex. genom bildning av acetättiksyra), verkar både bensoesyra och salicylsyra kraftigt hämmande. Möjligheten av att bensoesyra specifikt påverkar sådana processer genom att interferera med funktionen av coenzym A (CoA) diskuteras nedan. Andra grunder för den iakttagna specificiteten kan dock tänkas. Härvid bör skillnaden i natur mellan de processer, som hämmas (troligen är dessa bundna till specifika strukturer i cellen) och de som inte påverkas (katalyserade av enzym lösta i protoplasman), uppmärksammas.

Det påpekades ovan, att både bensoesyra och salicylsyra stimulerade hastigheten av syreupptagandet under de första stadierna av glykosoxidationen i försöken med *P. vulgaris*. Stimuleringen var störst när cellerna skördades i stationär fas, vilket kan sättas i samband med att den för inhibitorerna känsliga delen av processen, d. v. s. oxidationen av acetat, är av kvantitativt mindre betydelse i sådana celler (II). Salicylsyrans förmåga att öka hastigheten av syreupptagande och CO₂-produktion hos människor och djur efter administration i terapeutiska doser har tidigare ofta observerats (6, 7). Även i isolerade organ och vävnader ökas syrgaskonsumtionen med olika substrat i närvaro av salicylsyra (8).

Det kan i detta sammanhang påpekas, att en förhöjd respirationshastighet hos icke växande celler ofta åstadkommes av ämnen, som kopplar bort ATP-genereringen från själva oxidationsprocessen. Som

typiska exempel på sådana substanser kan nämnas 2,4-dinitrofenol och natriumazid.

De ovan sammanfattade resultaten har vissa beröringspunkter med av andra forskare publicerade undersökningar. Här kan nämnas ett arbete av Weinbach, Lowe, Frisell och Hellerman (9) rörande metaboliska effekter av kanelsyra och närbesläktade substanser däribland bensoesyra. Författarna visar, att de undersökta föreningarna i vävnader från råttor och marsvin åstadkommer en förskjutning i metabolismen genom att stimulera den aeroba bildningen av laktat från glykos. Den sålunda stegrade glykolyshastigheten kan enligt författarna bero på en minskad kapacitet för oxidation av fett- och aminosyror i de påverkade cellerna, eftersom dessa processer i andra undersökningar visats kunna hämmas specifikt av de studerade substanserna. Bensoesyrens roll i dessa sammanhang diskuteras längre fram i denna sammanfattning.

2. *Acetylgruppens metabolism*

Redan år 1935 publicerade Jowett och Quastel (10, 11) resultat från försök med levervävnad från marsvin, som visar, att vissa aromatiska syror hämmar bildningen av acetättiksyra från smörsyra och krotosyra i sådan cellvävnad utan att i lika hög grad påverka bildningen av CO_2 . Dessa observationer har senare varit föremål för detaljerade studier (12, 13, 14). Det har därvid framgått, att ett stort antal olika acyl-CoA komplex påverkar olika reaktioner hos acetyl-CoA i animala celler. Enligt Avigan, Quastel och Scholefield (14) hämmar bensoesyra i form av bensoyl-CoA i varierande grad kondensationen av acetyl-CoA a) med en annan molekyel acetyl-CoA till acetättiksyra, b) med oxalättiksyra till citronsyra och c) med sulfanilamid. Den känsligaste av dessa reaktioner är den förstnämnda, vilket kan förklara de av Jowett och Quastel observerade effekterna. Andra undersökningar (15) har visat, att även acetyleringen av p-aminobensoesyra hämmas av bensoesyra och salicylsyra.

Bensoesyrens specifika inverkan på acetatoxidationen hos olika mikroorganismer som de kommer till synes i författarens arbeten skulle åtminstone delvis kunna förklaras enligt ovanstående linjer, särskilt om mikroorganismerna ifråga innehåller enzym som kan koppla CoA med bensoesyra.

I artikel II beskrivs experiment, i vilka effekten av bensoesyra och

salicylsyra på CO_2 -avgivandet och bildningen av acetylfosfat under pyruvatdismutationen hos cellfria extrakt av *E. coli* studerades. Försöken tyder inte på någon större känslighet hos denna CoA-beroende process för närvaron av bensoesyra eller salicylsyra. I motsvarande försök med intakta celler hämmades CO_2 -avgivandet från pyruvat i betydligt högre grad. Som förut nämnts är det emellertid svårt att jämföra experiment som dessa bl. a. på grund av omöjligheten att uppskatta den verkliga inhibitor-koncentrationen inne i cellerna.

Det är naturligtvis inte uteslutet, att bensoesyran inverkan på acetylgruppens metabolism också hos mikroorganismer kan ha samband med funktionen av CoA och specifika effekter, som studerats i isolerade system. När det gäller intakta celler tillkommer emellertid andra faktorer, främst närvaron av komplicerade strukturer sörjande för organisationen inom enzymkomplex som TCA-cykeln. Det är inte sannolikt, att man när det gäller lipoidlösliga ämnen som bensoesyra och salicylsyra kan bortse från deras effekt på integriteten hos sådana system.

Oberoende av hur bensoesyra och salicylsyra påverkar oxidationen av acetat, visar författarens undersökningar, att det genomgående råder en mycket god överensstämmelse mellan de koncentrationer av inhibitorerna, som blockerar acetatoxidationen och de som stoppar tillväxt i en odlingslösning, som innehåller aminosyror. Förhållandena när det gäller tillväxt i medium utan aminosyror diskuteras i ett följande kapitel.

3. *Oxidation av syror i TCA-cykeln*

Redan av tidiga undersökningar framgår att bensoesyra och salicylsyra påverkar oxidationen av substanser, som senare visats vara intermediära föreningar i oxidationen av acetylgrupper. Sålunda observerade Collett och Clarke (16), att bensoesyra hämmar oxidationen av citronsyra, bärnstensyra och äppelsyra i muskelvävnad. Oxidationen av bärnstensyra befanns också påverkas av bensoesyra i arbeten av Måhlén (17) och Euler och Ahlström (18). Senare har effekten av bensoesyra och salicylsyra på olika enzym i TCA-cykeln studerats av Kaplan, Kennedy och Davis (19) i experiment med homogenat av rättvävnad.

I författarens egna undersökningar (IV) visade det sig, att hastigheten av oxidationen av TCA-cykeln's syror minskades av bensoesyra

och salicylsyra i koncentrationer något högre än de som stoppade tillväxt. En jämförelse med resultaten av acetatexperimenten visar, att oxidationen av acetat är märkbart känsligare. Detta pekar på, att den process som främst hämmas är aktiveringen av acetatmolekylen till acetyl-CoA eller kondensationen av acetyl-CoA och oxalacetat. Beträffande alla syrorna i cykeln efter α -ketoglutarsyra (de med tre karboxylgrupper oxideras ej av intakta celler av *P. vulgaris*) var såväl hastigheten av syreupptagandet utan inhibitor som den kvantitativa hämningen i närvaro av bensoesyra ungefär densamma. Syreupptagandet med α -ketoglutarsyra som substrat påverkades emellertid något kraftigare av bensoesyra, vilket är av intresse, då första steget här är en omvandling av α -ketoglutarsyra till succinyl-CoA i en reaktion av samma typ som omvandlingen av pyruvat till acetyl-CoA. Ingen blockering av oxidationsprocesserna på acetatnivån observerades i något fall, trots att detta borde varit tänkbart, då samtliga syror i TCA-cykeln via oxalacetat (eller malat) kan omvandlas till pyruvat. (Jämför diskussionen rörande skillnaden i bensoesyrens effekt på oxidationen av laktat och pyruvat.)

Resultaten överensstämmer i viss mån med dem som erhöles av Kaplan, Kennedy och Davis i ovan nämnda arbete (19) med rättvåvnads-homogenat av vilket framgår, att de känsligaste enzymen i detta system var α -ketoglutarsyradehydrogenas och bärnstensyradehydrogenas. Författarna påpekar emellertid, att deras experiment med äppelsyra som substrat tyder på, att bensoesyrens och salicylsyrens effekt är stor också på oxidationen av pyruvat eller kondensationen mellan acetyl-CoA och oxalacetat.

Blockering av assimilationsprocesser

I föregående kapitel påpekades, att bensoesyra och salicylsyra åtminstone under vissa förhållanden kraftigt stimulerar hastigheten av syreupptagandet vid oxidation av glykos, samtidigt som de blockerar processen på acetatnivån. Möjligheten av att dessa effekter är sekundära och ytterst orsakade av en störning av cellernas energimetabolism berördes.

Ämnen, som genom en bortkoppling av ATP-genereringen från oxidationsprocesserna åstadkommer en förhöjd respirationshastighet hos levande celler, förorsakar ofta också en ökning av den totalt upptagna mängden syre. En på detta sätt ökad substratnedbrytning

kan betraktas som ett försök av cellerna att kompensera ett ur energisynpunkt dåligt utbyte av oxidationen.

I många av författarens experiment har det visat sig, att bensoesyra och salicylsyra kan åstadkomma en sådan ökning i omfattningen av substratets oxidation (II, IV, VII). Effekten är störst på celler, som odlats med acetat som enda kolkälla, säkerligen beroende på, att sådana celler assimilerar en relativt sett stor mängd av det tillsatta substratet. Som exempel kan nämnas, att endast omkring 1 mol syre upptages per mol pyruvat i försök med acetatodlade celler jämfört med närmare det dubbla med celler odlade i rikt medium (II). Bensoesyran och salicylsyran förmåga att öka substratnedbrytningen kan emellertid iakttagas även med celler av det senare slaget (IV). Det bör påpekas, att resultaten beträffande salicylsyra är i princip analoga med dem som i många tidigare undersökningar erhållits i försök med animala celler (20). Särskilt kan salicylsyra hos t. ex. leverceller åstadkomma en kraftig minskning av glykogenförrådet. Inga liknande iakttagelser synes ha rapporterats i fråga om bensoesyra.

I artikel III visas i vanliga respirationsförsök att celler av *Ps. fluorescens* fullständigt oxiderar allt tillsatt acetat till koldioxid och vatten i närvaro av bensoesyra under upptagande av 2 mol syre per mol acetat. Resultaten bekräftas av experimenten med metyl- och karboxymärkt acetat (VII). Det är emellertid tydligt, att denna fullständiga hämning av alla assimilationsprocesser inträffar först vid bensoatkoncentrationer, som också påverkar hastigheten av syreupptagandet, vilket tyder på en relativt låg specificitet i hämningsmekanismen. Det kan dock påpekas, att en lika låg specificitet iakttagits i motsvarande försök med 2,4-dinitrofenol och natriumazid (21), trots att dessa ämnen, som tidigare nämnts, har en ytterst selektiv inverkan på ATP-genereringen vid oxidativa processer.

Bensoesyran inverkan på assimilationen av acetatkol studerades närmare med hjälp av metylmärkt acetat (VII). I dessa experiment undersöktes effekten på ackumuleringen av intermediära föreningar i mediet. Det visades, att ett stort antal sådana föreningar bildades varav pyrodruvsyra, α -ketoglutarsyra och succinat identifierades. Av de i artikeln reproducerade radioautogrammen framgår att bensoesyra hade en selektiv inverkan på syntesen av de olika substanserna.

Effekter på kvävetabolismen

År 1941 fann Klein och Kamin (22), att bensoesyra specifikt hämmar den av d-aminosyreoxidas katalyserade oxidationen av d-alanin. Denna upptäckt ledde till en rad undersökningar (23, 24, 25, 26, 27), som gick ut på att klarlägga hämningsmekanismen. Gruppen av studerade inhibitorer har till slut kommit att omfatta heterocykliska och acykliska såväl som de ursprungligen undersökta aromatiska karbonsyrorna. Den struktur hos inhibitormolekylen, som ansetts nödvändig för effekten, har under tiden alltmer generaliserats.

Troligen kan hämningen vara av olika art i olika fall (27), men åtminstone när det gäller de aromatiska karbonsyrorna, är den kompetitiv med avseende på substratet. Detta har förklarats med, att en viss likhet råder i struktur mellan de hämmande substanserna och den under oxidationen intermediära iminosyran.

Det är inte bara i isolerade enzymsystem som bensoesyra och liknande föreningar påverkar ammoniakbildande processer. Kort efter publicerandet av Klein och Kamins arbete fann Herner (28), att desamineringen av d- och l-aminosyror i njur- och levervävnad från råttor och i bakterier (*Bacterium coli*) hämmades av ett stort antal substanser. De verksammaste hade både en fenyl- och en karboxylgrupp i molekylen.

År 1951 visade Bernheim och DeTurk (29) i försök med *Pseudomonas aeruginosa*, att även den omvända processen, assimilationen av ammoniumjoner, specifikt påverkas av ämnen som bensoesyra och salicylsyra. Författarna påpekar, att deras resultat kan tyda på, att de hämmande ämnena blockerar bildningen eller utnyttjandet av energirika föreningar. Med tanke på den substrat-kompetitiva naturen hos hämningen av d-aminosyreoxidas borde det dock vara möjligt, att ämnen som bensoesyra och salicylsyra utövar samma effekt, då aminosyror bildas från motsvarande ketosyror och ammoniumjoner. Det har nyligen visats, att d- och l-aminosyreoxidas under anaeroba förhållanden kan katalysera en sådan process (30).

De av Bernheim och DeTurk (29) erhållna resultaten bekräftas av liknande försök med *P. vulgaris* (I), som visar att närvaron av ammoniumjoner under oxidationen av glykos stimulerar hastigheten av syreupptagandet, och att denna stimulering hämmas specifikt av bensoesyra.

År 1942 fann Ivánovics, att salicylsyra under vissa förhållanden specifikt påverkade syntesen av pantotensyra (31). I samma arbete

visades att olika aminosyror kraftigt minskade salicylsyrans tillväxthämmande effekt på mikroorganismer. Ivánovics påpekade, att aminosyrornas inverkan kunde förklaras av, att de stimulerade syntesen av pantotensyra. Det förefaller dock inte osannolikt med hänsyn till vad som ovan sagts, att effekten kan ha berott på att närvaron av aminosyror minskade behovet av assimilation av ammoniumjoner från mediet.

När det gäller bensoesyra, vars effekt också upphävs av olika aminosyror (VI), är ett sådant samband än troligare. I fråga om den relativa effekten av olika aminosyror föreligger ingen överensstämmelse mellan Ivánovics undersökningar och resultaten med bensoesyra, i det att salicylsyrans inverkan upphävdes främst av valin, lysin, leucin och metionin medan bensoesyrans påverkades mest av glutaminsyra, cystein och metionin. Beträffande övriga resultat i artikel VI är det av stort intresse, att bensoesyrs effekt synes vara av samma storleksordning under aeroba och anaeroba förhållanden. Detta pekar direkt på, att hämningen av TCA-cykeln funktion inte ensamt är av avgörande betydelse för den tillväxthämmande effekten.

Hämning av oxidativ fosforivering

Som i flera fall ovan berörts kan bensoesyrs och salicylsyrans inverkan på intakta bakterieceller vara en direkt följd av en störning i cellernas energimetabolism. Förmågan att effektivt koppla energigivande processer med den energikrävande uppbyggnaden av cellsubstans är ett nödvändigt villkor för celltillväxt och ytterst en fråga om en riktig organisation i rummet av de deltagande enzymen. Det är utan vidare klart, att denna labila organisation kan störas av en mångfald kemiska ämnen av t. ex. lipoidlöslig art. Att beskriva sådana effekter på intakta celler med utgångspunkt från kemiska reaktioner torde i de flesta fall vara mycket svårt.

En möjlighet att studera dessa frågor i isolerade system erbjuder emellertid de animala cellernas mitokondrier. Samtidigt med att arbetet med denna avhandling pågick publicerade Penniall, Kalnitsky och Routh (32) undersökningar med mitokondrier från råttthjärna, som visar, att salicylsyra specifikt hämmar den oxidativa fosforileringen hos dessa cellstrukturer. Resultaten bekräftas av författarens egna experiment (VIII), som också visar en liknande om än mindre

specifik och först vid högre koncentrationer uppträdande effekt när det gäller bensoesyra.

Bensoesyrens och salicylsyrens hämning av den oxidativa fosforyleringen hos mitokondrier stämmer i princip väl överens med författarens resultat rörande dessa inhibitorers inverkan på intakta bakterieceller. Man bör dock komma ihåg, att bakterier saknar direkt motsvarighet till de animala cellernas mitokondrier, varför jämförelser mellan effekternas kvantitativa storlek inte är möjliga.

Andra specifika effekter

Tvättade och icke växande celler av *Ps. fluorescens*, som odlats med acetat som enda kolkälla, oxiderar olika syror i TCA-cykeln först efter en adaptationsperiod av varierande längd. Bensoesyra och salicylsyra hämmar totalt de för adaptationen nödvändiga processerna vid koncentrationer, som inte påverkar oxidationen av ifrågavarande substrat hos redan adapterade celler (VII). Adaptiv enzymbildning är en komplicerad och föga känd process av energikrävande natur och beträffande bensoesyrens och salicylsyrens inverkan kan bara åter understrykas överensstämmelsen med effekten av ämnen som 2,4-dinitrofenol och azid.

En sådan överensstämmelse gäller också beträffande salicylsyrens stimulering av den endogena andningen hos bagerijäst (III). I detta sammanhang bör dock påpekas, att ingen motsvarande effekt observerats i försök med andra mikroorganismer. I allmänhet hämmas tvärtom den endogena andningen av både bensoesyra och salicylsyra. Hämningsgraden varierar från försök till försök och tycks främst vara beroende av hur cellerna odlats.

Diskussion

I de av författarens arbeten, som ligger till grund för denna avhandling, har bensoesyrens och salicylsyrens effekt på mikroorganismer studerats i en rad olika avseenden. Det har därvid blivit klart, att flera olika processer hämmas vid inhibitorkoncentrationer, som påverkar cellernas tillväxt och reproduktion. Vid en slutlig sammanfattning av det experimentella materialet bör främst tre punkter understrykas:

- A. Det existerar en genomgående överensstämmelse mellan effekterna av bensoesyra och salicylsyra.
- B. Båda inhibitorerna påverkar vid relativt låga koncentrationer följande processer hos intakta celler: acetatoxidationen, glykolys-hastigheten, omfattningen av substratnedbrytningen, NH_4^+ -assimilationen och bildningen av adaptiva enzym. Dessutom hämmas den oxidativa fosforyleringen hos isolerade mitokondrier.
- C. Samtliga ovan nämnda effekter på intakta celler kan mer eller mindre direkt vara en följd av en störning av cellernas energimetabolism.

Som påpekades redan i inledningen bör man inte vänta sig, att en molekyl med bensoesyrens enkla uppbyggnad skall visa någon hög grad av specificitet i effekten på olika enzymatiska processer. I detta avseende har salicylsyra på grund av närvaron av en hydroxylgrupp i ortoställning till karboxylgruppen större möjligheter. Den nära överensstämmelsen mellan bensoesyrens och salicylsyrens inverkan på olika processer visar dock, att denna konfiguration inte är av avgörande betydelse för de observerade effekterna.

Det är författarens åsikt, att den specificitet, som bensoesyra och salicylsyra trots allt visar, till stor del har sin grund i, att dessa ämnen genom sin lipoidlöslighet stör integriteten hos de cellstrukturer, som sörjer för organisationen inom enzymkomplex som TCA-cykeln. En sådan uppfattning synes stämma väl överens med den allmänna bild av bensoesyrens och salicylsyrens verkningsmekanism, som denna avhandling ger.

Med utgångspunkt från de i inledningen uppställda villkoren för att blockerandet av en viss reaktion skall kunna anses som orsaken till en tillväxthämmande effekt kan slutligen konstateras:

1. De studerade processerna är under de flesta förhållanden av vital betydelse för cellernas tillväxt och reproduktion.
2. Det råder god överensstämmelse mellan de koncentrationer av bensoesyra och salicylsyra, som behövs för att stoppa processerna ifråga och de som behövs för en tillväxthämmande effekt.
3. Om bensoesyra betraktas som grundsubstans, medför införandet av en hydroxylgrupp i ortoställning nästan genomgående, att effekten ökar både när det gäller tillväxthämningen och blockerandet av de studerade processerna. I det enda fall i författarens undersökningar där salicylsyra har mindre effekt än bensoesyra

på tillväxthastigheten, nämligen i försöken med bagerijäst, är också hämmningen av pyruvat och acetatoxidationen i motsvarande grad mindre.

Den första delen av det arbete som ligger till grund för denna avhandling utfördes vid Svenska Institutet för Konserveringsforskning (SIK), Göteborg. För det tillmötesgående som därvid visats mig vill jag till dåvarande föreståndaren för SIK, professor Georg Borgström, såväl som till nuvarande föreståndaren, docent Erik von Sydow, rikta ett varmt tack. Jag vill också betyga min stora tacksamhet mot professor Gösta Lindeberg, Norges Landbruks-högskole, Vollebekk, Norge och professor Erich Adler, Chalmers Tekniska Högskola, Göteborg, som på olika sätt gjort detta arbete möjligt.

Den senare delen av arbetet har utförts vid Statens Mejeriförsök, Alnarp. Till föreståndaren, professor Per Swartling, och till laborator Adam Deutsch ber jag likaledes att få uttrycka min stora tacksamhet för den hjälp och den värdefulla kritik, som under denna tid kommit mig till del.

En del speciella undersökningar har kommit till utförande vid andra institutioner. Jag vill i detta sammanhang rikta ett varmt tack till professor Gösta Ehrensvärd, Biokemiska Institutionen, Lund för det bistånd han vid upprepade tillfällen givit mig. För den välvilja och det intresse som visats mig av docent Lars Ernster, Wenner-Grens Institut, Stockholm står jag också i tacksamhets-skuld.

Referenser

1. GOSHORN, R. H., DEGERING, E. F. & TETRAULT, P. A. *Ind. Eng. Chem.* 30 (1938) 646.
2. RAHN, O. & CONN, J. E. *Ind. Eng. Chem.* 36 (1944) 185.
3. WYSS, O. *Advances in Food Research* 1 (1948) 373.
4. SCHELHORN, M. VON *Deut. Lebensm.-Rundschau* 46 (1950) 132.
5. SCHELHORN, M. VON *Deut. Lebensm.-Rundschau* 46 (1950) 151.
6. COCHRAN, J. B. *Brit. Med. J.* 2 (1952) 964.
7. MEADE, B. W. *Ann. Rheumatic Diseases* 13 (1954) 60.
8. SMITH, M. J. H. & JEFFREY, S. W. *Biochem. J.* 63 (1956) 524.
9. WEINBACH, E. C., LOWE, H. J., FRISELL, W. R. & HELLERMAN, L. *J. Biol. Chem.* 189 (1951) 779.
10. JOWETT, M. & QUASTEL, J. H. *Biochem. J.* 29 (1935) 2143.
11. JOWETT, M. & QUASTEL, J. H. *Biochem. J.* 29 (1935) 2159.
12. BROWN, W. T. & SCHOLEFIELD, P. G. *Biochem. J.* 58 (1954) 368.
13. AVIGAN, J. & SCHOLEFIELD, P. G. *Biochem. J.* 58 (1954) 374.
14. AVIGAN, J., QUASTEL, J. H. & SCHOLEFIELD, P. G. *Biochem. J.* 60 (1955) 329.
15. KOIVUSALO, M. & LUUKKAINEN, T. *Acta Physiol. Scand.* 45 (1959) 283.
16. COLLETT, M. E. & CLARKE, M. F. *J. Biol. Chem.* 82 (1929) 429.
17. MÅHLÉN, S. *Skand. Arch. Physiol.* 53 (1928) 152.
18. EULER, H. VON & AHLSTRÖM, L. *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.* 16 B (1943) no. 16.
19. KAPLAN, E. H., KENNEDY, J. & DAVIS, J. *Arch. Biochem. Biophys.* 51 (1954) 47.
20. SMITH, M. J. H. *J. Pharm. and Pharmacol.* 11 (1959) 705.
21. CLIFTON, C. E. *Enzymologia* 4 (1937) 246.
22. KLEIN, J. R. & KAMIN, H. *J. Biol. Chem.* 138 (1941) 507.
23. HELLERMAN, L., LINDSAY, A. & BOVARNICK, M. R. *J. Biol. Chem.* 163 (1946) 553.
24. BARTLETT, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* 70 (1948) 1010.
25. KLEIN, J. R. *J. Biol. Chem.* 205 (1953) 725.
26. FRISELL, W. R., LOWE, H. J. & HELLERMAN, L. *J. Biol. Chem.* 223 (1956) 75.
27. YAGI, K., OZAWA, T. & OKADA, K. *Biochim. et Biophys. Acta* 35 (1959) 102.
28. HERNER, B. *Acta Physiol. Scand.* 8 (1944) suppl. 23.
29. BERNHEIM, F. & DETURK, W. E. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 103 (1951) 107.
30. RADHAKRISHNAN, A. N. & MEISTER, A. *J. Biol. Chem.* 233 (1958) 444.
31. IVÁNOVICS, G. *Z. physiol. Chem. Hoppe-Seyler's* 276 (1942) 33.
32. PENNIAL, R., KALNITSKY, G. & ROUTH, J. I. *Arch. Biochem. Biophys.* 64 (1956) 390.

Innehåll

Inledning	3
Avsikten med undersökningen	4
pH-värdets inflytande på effekten	5
Inverkan på olika oxidativa processer	6
1. Oxidation av glykos, pyruvat och laktat	6
2. Acetylgruppens metabolism	8
3. Oxidation av syror i TCA-cykeln	9
Blockering av assimilationsprocesser	10
Effekter på kvävemetabolismen	12
Hämning av oxidativ fosforylering	13
Andra specifika effekter	14
Diskussion	14

